

ОТЗЫВ

официального оппонента о работе **Гопаненко Александра Витальевича**
«Новые функции рибосомных белков eS1, uS19 и eL29 человека,
выявленные с помощью методов, основанных на высокопроизводительном
секвенировании РНК», представленной на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

В настоящее время интенсивно проводятся работы по исследованию главного процесса организма человека – экспрессии генов, последним этапом которого является трансляция. В состав рибосомы – сложной мультибелково-нуклеиновой органеллы, с участием которой осуществляется синтез белков, входит до 80 рибосомных белков, некоторые из которых обладают внерибосомными (неканоническими) функциями.

Учитывая многокомпонентность всех этапов экспрессии, взаимодействие участников, а также возможное влияние любого из компонентов, в том числе и рибосомных белков, на регуляцию каждого этапа, **актуальность** работы, посвященной выявлению новых неканонических функций трех белков «домашнего хозяйства» рибосомы, не вызывает сомнений.

Диссертационная работа А.В. Гопаненко состоит из общепринятых разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение результатов, Заключение, Выводы, Список литературы; кроме того, содержит два Приложения.

Во **Введении** описана актуальность проблемы, обоснованы и сформулированы цель и задачи настоящего исследования.

Обзор литературы посвящен анализу литературных данных (343 источника) о роли рибосомных белков млекопитающих в регуляции экспрессии генов – проблеме, непосредственно связанной с темой диссертационной работы. При этом рассмотрены как их конститутивные функции в составе рибосомы, так и их роль в репликации и репарации генома, детально проанализированы аспекты участия рибосомных белков в процессинге РНК, процессах регуляции транскрипции и трансляции. Кроме того, представлены данные по взаимодействию рибосомных белков с компонентами вирусов.

Раздел **«Методы»** содержит детальное, четкое и воспроизводимое описание широкого спектра современных молекулярно-биологических и биохимических

подходов, использованных в работе: дизайн и создание генетических конструкций, методы работы с клеточными культурами, методы высокопроизводительного секвенирования РНК и изучения РНК-белковых взаимодействий *in vitro*, а также биоинформатический анализ данных и анализ структурных моделей 40S рибосомных субчастиц и РНК.

В начале главы **«Результаты»** детально рассмотрены возможности методов высокопроизводительного секвенирования PAR-CLIP и РНК-сек и обоснование их применения для последовательного решения поставленных задач по исследованию функций трех целевых рибосомных белков. Так, с использованием метода PAR-CLIP показано, что белок eS1 в клетке взаимодействует с РНК, кодируемыми генами U11 и U5 мРНК, в U-богатых районах. Кроме того, установлено, что eS1 участвует в процессинге U11 пре-мРНК и сплайсинге пре-мРНК в составе минорной сплайсосомы, где он взаимодействует со зрелой U11 мРНК. Применение метода PAR-CLIP, включающего элементы рибосомного профайлинга, позволило идентифицировать регионы мРНК, содержащие чередующиеся разнозаряженные аминокислотные участки, с которыми взаимодействует белок uS19 во время остановок рибосом на этих регионах в процессе элонгации трансляции. С помощью РНК-сек показана существенная роль нарушения баланса белка eL29 в клетке в регуляции экспрессии генов, которая выражается в изменении экспрессии 1308 белок-кодирующих генов, среди которых присутствуют гены-мишени белков онкогенеза.

В главе **«Обсуждение»** рассмотрены полученные результаты на уровне клеточных процессов. Так, представлено участие белка eS1 в последовательных процессах транскрипции, процессинга и сплайсинга пре-мРНК с детальным обсуждением его роли на каждом этапе. На уровне моделей рибосом с привлечением данных по структурно-функциональной топографии многокомпонентной трансляционной машины рассмотрена функциональная роль С-концевого эукариот/архей-специфичного хвоста uS19 в А-участке в процессе элонгации трансляции и состояние А-участка в остановленных рибосомах. Детально обсуждаются клеточные пути и процессы, в которые могут быть вовлечены продукты генов, активность которых зависит от содержания рибосомного белка eL29. Предложена гипотетическая схема, демонстрирующая влияние дефицита eL29 в клетках на экспрессию генов, приводящее к значимой реорганизации регуляции активностей 1308 белок-кодирующих генов при снижении уровня eL29 в 2.5 раза. И, наконец, в **Заключении** автор кратко суммирует все полученные в настоящей работе оригинальные результаты в

контексте их важности для понимания механизмов разнообразных клеточных процессов, а также наследственных заболеваний и злокачественной трансформации клеток.

Интерпретация экспериментальных результатов, предложенная автором, аргументирована.

В рамках общих требований к оформлению диссертации приятно отметить, что диссертация иллюстрирована цветными рисунками, написана логично, хорошим русским языком с небольшим количеством опечаток, ошибок и неудачных выражений.

В качестве одного из замечаний следует отметить то, что в диссертационной работе остались нерешенными некоторые вопросы, касающиеся структурно-функциональных аспектов взаимодействия рибосомного белка eS1 с U5 мРНК и/или её предшественником. Другое замечание относится к объяснению результатов, полученных при аффинной модификации рибосом 4-тиоуридин-содержащими аналогами мРНК, которые показали отсутствие сшивок с белком uS19 в комплексах, где остаток s⁴U находился в А-участке, занятом молекулой тРНК. На основании этих результатов диссертант делает заключение о том, что uS19 контактирует с кодоном мРНК в А-участке только при отсутствии в нем молекулы тРНК. Однако при этом нельзя исключить, что сшиванию uS19 с s⁴U-содержащим кодоном мРНК в А-участке могла препятствовать неблагоприятная конформация его С-концевого хвоста, которую он мог бы принимать при образовании соответствующего кодон-антикодового дуплекса. Поэтому вышеуказанное заключение кажется не вполне обоснованным.

Сделанные замечания не носят принципиального характера, не умаляют достоинств работы и не влияют на основные выводы, которые обоснованы и не вызывают сомнения.

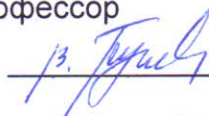
Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и опубликованным автором работ по исследуемой проблеме в высокорейтинговых научных журналах.

Представленная к защите работа А.В. Гопаненко является научно-квалификационной работой, выполненной на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях, в которой решена задача выявления новых неканонических функций рибосомных белков eS1, uS19 и eL29 человека с использованием методов высокопроизводительного секвенирования РНК, позволяющих исследовать на нуклеотид-разрешающем уровне белково-нуклеиновые взаимодействия. Решение этой задачи имеет большое значение для

установления структурно-функциональных аспектов молекулярных механизмов элонгации трансляции как конечного этапа важнейшего процесса клетки – экспрессии генов.

Таким образом, по актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости представленная диссертация отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.03 – молекулярная биология, а также критериям, определенным пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена согласно Приложениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации, Александр Витальевич Гопаненко, безусловно, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Главный научный сотрудник
лаборатории ферментов репарации
Института химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН,
доктор биологических наук, профессор



Бунева Валентина Николаевна

Новосибирск, 630090, ул. Ильича, д. 1, кв. 54
тел. сл.+7-(383)-363-51-27 buneva@niboch.nsc.ru

Подпись Буневой В.Н. заверяю.

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН

/к.х.н. Пестряков П.Е./



03 ноября 2020 г.